

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑪ **DE 3806558 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 38 06 558.4  
㉑ Anmeldetag: 1. 3. 88  
㉒ Offenlegungstag: 15. 9. 88

⑤1 Int. Cl. 4:  
**G 01 N 33/543**  
G 01 N 33/554  
G 01 N 33/577  
// C12N 5/00

DE 3806558 A1

*Verbreitung*

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
03.03.87 JP P 62-48242

⑦1 Anmelder:  
Hitachi, Ltd., Tokio/Tokyo, JP

⑦4 Vertreter:  
Bardehle, H., Dipl.-Ing.; Dost, W., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat.; Altenburg, U., Dipl.-Phys.; Hoffmann, W.,  
Dipl.-Phys.; Wallinger, M., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.,  
Pat.-Anwälte; Pagenberg, J., Dr.jur.; Frohwitter, B.,  
Dipl.-Ing., Rechtsanwälte; Geißler, B.,  
Dipl.-Phys.Dr.-jur., Pat.- u. Rechtsanwäl.; Kroher, J.,  
Dr.; Kowal-Wolk, T., Dr.-jur., Rechtsanwälte, 8000  
München

⑦2 Erfinder:  
Suzuki, Matsumi; Imai, Kyoko, Katsuta, JP

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑥4 Verfahren zur Zellmessung

Eine zu testende Zelle kann exakt und mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden, indem man einen Antikörper, der spezifisch mit der zu testenden Zelle reagiert, in haftende Verbindung mit Mikrokapseln oder Latexteilchen bringt, die zu testende Zelle mit dem Antikörper, an dem die zu testenden Zellen oder Latexteilchen haften, reagieren läßt und anschließend die zu testenden Zellen durch Lichtstreuung, Lichtabsorption oder Fluoreszenz unter Anwendung von Fließzytometrie nachweist.

DE 3806558 A1

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Zellmessung, dadurch gekennzeichnet, dass man

- einen Antikörper, der spezifisch mit einer zu testenden Zelle reagiert, an Mikrokapseln oder Latexteilchen anbringt,
- die zu testende Zelle mit dem an den Mikrokapseln oder Latexteilchen haftenden Antikörper reagieren lässt und
- die zu testende Zelle durch Lichtstreuung, Lichtabsorption oder Fluoreszenz nachweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis der zu testenden Zelle durch Fliesszytometrie erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrokapseln eine Licht absorbierende Substanz oder eine fluoreszierende Substanz enthalten.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Mikrokapseln um Liposomen handelt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Antikörper um einen monoklonalen Antikörper handelt.

6. Verfahren zur Zellmessung, dadurch gekennzeichnet, dass man

- einen Antikörper, der spezifisch mit einer zu testenden Zelle reagiert, an Mikrokapseln, die eine lichtabsorbierende Substanz oder eine fluoreszierende Substanz enthalten, anbringt,
- die zu testende Zelle mit dem an den Mikrokapseln haftenden Antikörper reagieren lässt und
- anschliessend die zu testende Zelle durch Lichtabsorption oder Fluoreszenz unter Anwendung von Fliesszytometrie nachweist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich beim Antikörper um einen monoklonalen Antikörper handelt.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Mikrokapseln um Liposomen handelt.

9. Verfahren zur Zellmessung, dadurch gekennzeichnet, dass man

- einen Antikörper, der spezifisch mit einer zu testenden Zelle reagiert, an Latexteilchen anbringt,
- die zu testende Zelle mit dem an den Latexteilchen haftenden Antikörper reagieren lässt und
- anschliessend die zu testende Zelle durch Lichtstreuung und Anwendung von Fliesszytometrie nachweist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Latexteilchen aus Polystyrol hergestellt worden sind.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich beim Antikörper um einen monoklonalen Antikörper handelt.

12. Verfahren zur Zellmessung, dadurch gekennzeichnet, dass man

– Mikrokapseln oder Latexteilchen mit einer Mehrzahl von unterschiedlichen, daran haftenden Antikörpern bereitstellt, wobei die Antikörper spezifisch mit der gleichen zu testenden Zelle reagieren,

– die zu testende Zelle mit einer Mehrzahl der unterschiedlichen, an den Mikrokapseln oder Latexteilchen haftenden Antikörper reagieren lässt und

– anschliessend die zu testende Zelle durch Lichtstreuung, Lichtabsorption oder Fluoreszenz unter Anwendung von Fliesszytometrie nachweist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrokapseln eine lichtabsorbierende Substanz oder eine fluoreszierende Substanz enthalten und der Nachweis der zu testenden Zelle durch Lichtabsorption oder Fluoreszenz durchgeführt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass sich bei den Mikrokapseln um Liposomen handelt.

15. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass Latexteilchen mit daran haftenden, unterschiedlichen Antikörpern bereitgestellt werden und der Nachweis der zu testenden Zelle durch Lichtstreuung durchgeführt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Latexteilchen aus Polystyrol hergestellt worden sind.

17. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den unterschiedlichen Antikörpern um monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche, auf der Oberfläche der zu testenden Zelle vorliegende Antigene handelt.

18. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu testenden Zellen um verschiedene Typen von funktionellen T-Zellen handelt.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Zellmessung, insbesondere ein mittels Fliesszytometrie vorgenommene Verfahren, das einen exakten Nachweis, d.h. eine qualitative Analyse und/oder eine quantitative Bestimmung von nur einer gewünschten Zelle in einer Gruppe von zahlreichen Typen von Zellen, ermöglicht.

Bei einem herkömmlichen Verfahren zur Zellmessung durch Fliesszytometrie werden Zellen durch ein enges Rohr geleitet, mit einem Laserstrahl bestrahlt und aufgrund der Streuung nachgewiesen. Ein weiteres herkömmliches Verfahren zur Zellmessung durch Fliesszytometrie besteht darin, dass man eine fluoreszierende Substanz direkt oder indirekt an einem Antikörper, der spezifisch mit den zu testenden Zellen reagiert, anbringt, die zu testenden Zellen mit dem mit der fluoreszierenden Substanz markierten Antikörper reagieren lässt und dabei feststellt, ob es sich um die gesuchten Zellen handelt oder nicht. Dabei werden beim letztgenannten Verfahren die gesuchten Zellen mit der fluoreszierenden Substanz markiert, so dass sie von unmarkierten Zellen unterscheidbar sind.

Ein Verfahren zum Anbringen des fluoreszierenden Markers am Antikörper bei der letztgenannten herkömmlichen Methode wird von Ohta et al., Flow Cytometry (Technique and Practice), Kani Shobo Co., Ltd.,

21.4.1984, Seiten 110 – 121 beschrieben.

Eine zur Fliesszytometrie verwendete Messvorrichtung ist in JA-OS 2 09 147/85 beschrieben.

Jedoch gelingt es bei dem herkömmlichen Verfahren unter Anbringen einer fluoreszierenden Substanz an einem Antikörper nicht in ausreichendem Masse, die fluoreszierende Substanz in haftende Verbindung mit dem Antikörper zu bringen. Daher ist der Fluoreszenzanteil unzureichend und die mit der fluoreszierenden Substanz markierten Zellen lassen sich nicht exakt nachweisen. Ferner ist es unmöglich, aus dem Fluoreszenzanteil die Zellen genau quantitativ zu ermitteln oder den Antigenanteil auf der Zelloberfläche exakt zu messen.

Das herkömmliche Verfahren zur Zellmessung durch Fliesszytometrie unter Anwendung der Lichtstreuung ist insofern mit Nachteilen behaftet, als die Intensität der Streuung aufgrund der unzureichenden Grösse der Zellen gering ist.

Daher gelingt der Nachweis der Zellen aus der Intensität der Streuung nicht exakt.

In der JA-OS 1 32 870/86 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem verschiedene Immunglobuline durch Fliesszytometrie unter Verwendung von Latexteilchen, die sich im Durchmesser voneinander unterscheiden, nachgewiesen werden. Bei einem derartigen Verfahren werden nicht nur Latexteilchen mit einem daran angebrachten Antikörper, sondern auch mit einer fluoreszierenden Substanz markierte Antikörper verwendet. Daher ist ein aufwendiges Messverfahren erforderlich. Ausserdem ist der Anteil der an den Antikörper gebundenen fluoreszierenden Substanz genau so gering wie beim herkömmlichen Verfahren, so dass die Signale nicht ausreichen, den Anteil der umgesetzten fluoreszierenden Substanz von der Lichtstreuung der nicht-umgesetzten Latexteilchen klar zu unterscheiden. Demgemäss lassen sich bei Anwendung dieses Verfahrens auf die Zellmessung Zellen nicht auf einfache Weise nachweisen.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Zellmessung bereitzustellen, das einen exakten und einfachen Nachweis, d.h. eine qualitative und/oder quantitative Analyse der zu testenden Zellen, ermöglicht, wobei die vorerwähnten Schwierigkeiten überwunden werden.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Zellmessung, bei dem man

- einen Antikörper, der spezifisch mit einer zu testenden Zelle reagiert, an Mikrokapseln oder Latexteilchen anbringt,
- die zu testenden Zelle mit dem an den Mikrokapseln oder Latexteilchen haftenden Antikörper reagieren lässt und
- anschliessend die zu testende Zelle durch Lichtstreuung, Lichtabsorption oder Fluoreszenz nachweist.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Zellmessung, bei dem man

- einen Antikörper, der spezifisch mit einer zu testenden Zelle reagiert, an Mikrokapseln, die eine lichtabsorbierende Substanz oder eine fluoreszierende Substanz enthalten, anbringt,
- die zu testende Zelle mit dem an den Mikrokapseln haftenden Antikörper reagieren lässt und
- anschliessend die zu testende Zelle durch Lichtabsorption oder Fluoreszenz unter Anwendung

von Fliesszytometrie nachweist.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Zellmessung, bei dem man

- Mikrokapseln oder Latexteilchen mit einer Mehrzahl von daran haftenden, unterschiedlichen Antikörpern bereitstellt, wobei die Antikörper spezifisch mit der gleichen zu testenden Zelle reagieren,
- die zu testende Zelle mit einer Mehrzahl der an den Mikrokapseln haftenden, unterschiedlichen Antikörper oder Latexteilchen reagieren lässt und
- anschliessend die zu testende Zelle durch Lichtstreuung, Lichtabsorption oder Fluoreszenz unter Anwendung von Fliesszytometrie nachweist.

Da erfindungsgemäss ein oder mehrere Antikörper, die spezifisch mit einer zu testenden Zelle reagieren, an Mikrokapseln oder Latexteilchen angebracht sind, werden folgende Wirkungen erzielt. Die Grösse der Zelle, an der Latexteilchen oder Mikrokapseln haften, ist im Vergleich zum Zustand vor dem Anbringen dieser Körper grösser, so dass die Intensität des gestreuten Lichts erhöht wird. Ferner führt die Einkapselung einer lichtabsorbierenden Substanz oder einer fluoreszierenden Substanz in den Mikrokapseln zu einer Erhöhung der absoluten Menge der lichtabsorbierenden Substanz oder der fluoreszierenden Substanz. Dadurch wird das Absorptionssignal oder Fluoreszenzsignal verstärkt.

Aufgrund der Verstärkung des Absorptionssignals oder Fluoreszenzsignals ist ein sehr exakter Nachweis, d.h. eine qualitative und quantitative Analyse von gewünschten, speziell zu testenden Zellen möglich. Gemäss dem erfindungsgemässen Messverfahren lässt sich eine exakte qualitative und quantitative Zellanalyse nach einem sehr einfachen Verfahren vornehmen.

Nachstehend wird die Erfindung an Hand der Zeichnung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 ein Fließschema einer Ausführungsform der Erfindung;

Fig. 2 eine schematische Darstellung der Struktur eines Fliesszytometers;

Fig. 3 ein Histogramm zur Erläuterung der Beziehung der Fluoreszenzintensität einer gemäss der Ausführungsform von Fig. 1 behandelten Probe und der Zellzahl;

Fig. 4 ein Diagramm zur Erläuterung der Beziehung zwischen der Fluoreszenzintensität und der Zellzahl bei einem herkömmlichen Verfahren, bei dem eine fluoreszierende Substanz direkt an einer zu testenden Zelle angebracht wird;

Fig. 5 ein Fließschema einer weiteren Ausführungsform der Erfindung, bei der die Zellmessung unter Verwendung einer Mehrzahl von unterschiedlichen Antikörpern erfolgt;

Fig. 6 ein Diagramm zur Erläuterung der Beziehung zwischen der Fluoreszenzintensität und der durch die in Fig. 5 gezeigten Ausführungsform bestimmten Zellzahl;

Fig. 7 ein Histogramm zur Erläuterung der Beziehung zwischen der Fluoreszenzintensität und der durch eine weitere Ausführungsform der Erfindung bestimmten Zellzahl, wobei anstelle von Liposomen fluoreszierende Latexteilchen verwendet werden.

Bei der in Fig. 1 gezeigten Ausführungsform der erfindungsgemässen Zellmessung ist eine Markierungssubstanz 2 in Mikrokapseln 1 eingekapselt. Als markierende Verbindung kann entweder eine lichtabsorbieren-

de Substanz oder fluoreszierende Substanz verwendet werden. Bei der Einkapselung einer fluoreszierenden Substanz beträgt deren Menge im allgemeinen das 100- bis 1000-fache der Menge, die beim herkömmlichen Verfahren eingesetzt wird, bei der eine fluoreszierende Substanz an einem Antikörper angebracht wird. Infolgedessen wird das Signal zum Zelnachweis auf das 100 bis 1000-fache verstärkt. Durch die Verstärkung des Signals erhöht sich die Empfindlichkeit zum genauen Nachweis der gewünschten Zellen in Unterscheidung von einer Gruppe anderer Zellen.

Im Falle einer lichtabsorbierenden Substanz wird deren absolute Menge ebenso wie im Fall einer fluoreszierenden Substanz erhöht, so dass die Intensität der Absorption verstärkt wird. Infolgedessen kann die Menge des unter Einwirkung der zu testenden Zellen absorbierten Lichts exakt bestimmt werden, wobei eine Unterscheidung von der Lichtmenge, die auf eine Gruppe von anderen Zellen zurückzuführen ist, möglich ist. Auf diese Weise gelingt der Nachweis und die quantitative Bestimmung der gewünschten Zellen.

Anschließend wird ein Antikörper 3 an den die markierende Substanz einkapselnden Mikrokapseln angebracht. Der markierte Antikörper 4 wird mit der zu testenden Zelle umgesetzt, um eine Antigen-Antikörper-Reaktion hervorzurufen. Bei Anwendung eines spezifisch mit den zu testenden Zellen (z.B. Krebszellen) reagierenden Antikörpers reagiert ein Antigen 6 der zu testenden Zelle mit dem markierten Antikörper 4, so dass die zu testende Zelle mit einer fluoreszierenden Substanz oder lichtabsorbierenden Substanz markiert wird.

Die auf diese Weise erhaltene markierte Zelle 7 wird in ein Fliesszytometer (vgl. Fig. 2) eingeführt.

In Fig. 2 wird ein Strom von Zellen 21 in einem Behälter 22 erzeugt. Es entsteht ein Strom von Einzelzellen in einer Durchflusszelle 24. Eine Lichtquelle 23 ist auf der Höhe der Durchflusszelle 24 angeordnet. Auf der anderen Seite der Durchflusszelle 24 befindet sich ein Schlitz 25. Durch den Schlitz 25 hindurchtretendes Licht gelangt in einen Detektor 26. Vom Detektor 26 wird ein Nachweissignal an den Signalprozessor 27 abgegeben. Im Signalprozessor 27 wird aus dem Fluoreszenzanteil oder dem Anteil des absorbierten Lichts eine qualitative und quantitative Messung der zu testenden Zellen durchgeführt.

Die zu testenden Zellen gelangen durch das enge Rohr (Durchflusszelle) und werden aus der Lichtquelle 23 mit einem Laserstrahl bestrahlt. Ob es sich um die zu testende Zelle handelt oder nicht, lässt sich aus dem Fluoreszenzanteil oder dem Anteil an absorbiertem Licht in der durch die Bestrahlung mit dem Laserstrahl hervorgerufenen Fluoreszenzemission oder Lichtabsorption beurteilen. Es kann auch eine quantitative Bestimmung der zu testenden Zellen durchgeführt werden. Ferner lässt sich eine qualitative und quantitative Analyse der zu testenden Zellen auch durch Lichtstreuung ermitteln. Es kann auch eine Zellsortiervorrichtung an den in Fig. 2 gezeigten Fliesszytometer angeschlossen werden. Die zu testenden Zellen gelangen zusammen mit einem Wasserstrahl nach unten. Wenn sie genau die Stelle erreichen, wo sich der Wasserstrahl in Wassertropfen verwandelt, wird dem Wasserstrahl eine positive oder negative elektrische Ladung erteilt. Weist die Zelle eine negative Ladung auf, so werden die Zelle enthaltende Tropfen während des Durchlaufens eines durch eine hohe Spannung erzeugten elektrischen Felds 28 in Richtung zu einer positiven Elektrode abgelenkt,

so dass die Richtung der gesamten Wassertropfen zur positiven Elektrode hin verändert wird. Die zu testenden Zellen lassen sich auf diese Weise von anderen Zellen abtrennen und in einem Probensammelgefäß 29 auffangen.

Nachstehend wird ein konkretes Ausführungsbeispiel zur Erläuterung der in Fig. 1 gezeigten Ausführungsform näher erklärt.

Als Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln lässt sich die Methode von Hsia et al., *Methods in Enzymology*, Band 74, Seite 152 anwenden. Als in die Mikrokapseln einzuführende Markierungssubstanz können beliebige Substanzen verwendet werden, sofern es sich um fluoreszierende oder lichtabsorbierende Substanzen handelt. Als fluoreszierende Substanzen kommen beispielsweise Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Rhodamin-isothiocyanat (RITC), substituiertes Rhodamin-Isothiocyanat (SRITC) und Rhodamin B in Frage. Bei Verwendung von FITC ist dessen Konzentration bei der Herstellung von Mikrokapseln zu berücksichtigen, da es bei einer zu hohen Konzentration zu einem Auslöschvorgang kommt. Als lichtabsorbierende Substanzen können beispielsweise chelatbildende Mittel, wie Arsenazo-III (2,7-Bis-(2-arsonophenylazo)-1,8-dihydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure), 5-Br-PAPS (2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfo-propylamino)-phenylnatriumsalz), Chromazurol B (2,6-Dichlor-3',3''-dimethyl-4-hydroxyfuchson-5',5''-dicarbonsäure) und Chromazurol S (3-Sulfo-2,6-dichlor-3',3''-dimethyl-4-hydroxyfuchson-5',5''-Dicarbonsäure), Methylcascinblau (4-Methylumbelliferonmethylen-N-methylglycin), Neo-Thorin (2-(1,8-Dihydroxy-3,6-disulfo-2-naphtylazo)-phenylarsonsäure), TAMSMB (2-(2-Thiazolylazo)-4-methyl-5-sulfomethylaminobenzosäure), Amidoschwarz, Riboflavin und Methylrot verwendet werden.

Als Verfahren zur Herstellung einer haftenden Verbindung eines Antikörpers an Liposomen kommt ein herkömmliches Verfahren gemäss *Nature*, Band 288, (1980), Seite 602–604 in Frage. Dabei wird ein Antikörper an Liposomen unter Verwendung eines Vernetzungsmittels, wie SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridylthio)-propionat), SMPB (N-Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat), SMPA (N-Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-acetat) oder dergl. angebracht. Erfindungsgemäss können beispielsweise als von Liposomen abweichende Mikrokapseln Erythrozyten-„Geistmembranen“ verwendet werden.

Wird die erfindungsgemässe Zellmessung unter Einsatz eines Antikörpers mit daran haftenden Latexteilchen durchgeführt, so lässt sich das Reagenz beispielsweise nach folgendem Verfahren herstellen.

Als Latexteilchen werden solche aus Polystyrol bevorzugt. Der Teilchendurchmesser liegt vorzugsweise im Bereich von  $10^{-4}$  m bis  $10^{-10}$  m. Die Latexteilchen können gefärbt sein. Ein Verfahren zum Anbringen eines Antikörpers an Latexteilchen umfasst beispielsweise das Homogenisieren der Latexteilchen und des Antikörpers in einer geeigneten Pufferlösung, wobei der Antikörper durch physikalische Adsorption in haftende Verbindung mit den Latexteilchen gebracht wird.

Zur exakten Zellmessung wird erfindungsgemäss die Verwendung von monoklonalem Antikörper bevorzugt. Das Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers ist zur Stimulierung der Reaktionsgeschwindigkeit besonders bevorzugt.

Nachstehend wird ein bevorzugtes Verfahren zur Aufbereitung der zu testenden Zellen, z.B. die Herstellung einer Zellsuspension aus Blut, näher erläutert. In

einem Reagenzglas mit einem Gehalt an Antikoagulationsmittel werden 10 ml Blut aufgefangen. Das Blut wird zentrifugiert (700 xg), um Plasma und Gerinnungshäutchen voneinander zu trennen. Das Plasma wird entfernt und das Gerinnungshäutchen mit einer Pipette gewonnen. Sodann wird das Gerinnungshäutchen mit 10 ml Puffer aufgefüllt. Die erhaltene Suspension wird auf 5 ml Ficoll-Hypaque in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen aufgebracht und 20 Minuten bei 700 xg zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht eine mononukleare Zellschicht zwischen einer Schicht des Suspensionsmediums und einer Ficoll-Hypaque-Schicht. Die Schicht wird mittels einer Pipette gewonnen, in ein 15 ml-Reagenzglas gebracht und in Puffer suspendiert. Eine 10minütige Zentrifugation wird etwa zweimal wiederholt, um einen zentrifugalen Waschvorgang durchzuführen. Nach dem Waschen wird eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 5 bis  $10 \times 10^6$  Zellen/ml unter Verwendung von Puffer hergestellt. 100 µl der erhaltenen Zellsuspension werden zu 5 bis 10 µl einer Vorratslösung von mit Mikrokapseln markiertem monoklonalem Antikörper gegeben. Dabei enthalten die Mikrokapseln die vorstehend beschriebene fluoreszierende Substanz. Die Temperatur bei der Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen auf der Zelloberfläche beträgt 4°C. Das Gemisch der Zellsuspension und der Vorratslösung wird etwa 30 Minuten stehen gelassen. Nach beendeter Antigen-Antikörper-Reaktion wird der zentrifugale Waschvorgang dreimal unter Verwendung von Phosphatpuffer wiederholt und schliesslich werden die Zellen in Phosphatpuffer auf ein Gesamtvolumen von 4–500 µl resuspendiert. Die erhaltene Suspension wird in den in Fig. 2 gezeigten Fließszytometer gegeben.

Antigen auf der Membranoberfläche von T-Zellen wird auf die vorstehend beschriebene Weise untersucht. Zunächst wird anti-Leu 3a (T-Helfer/Inducer)-monoklonaler Antikörper als monoklonaler Antikörper verwendet. FITC wird in Mikrokapseln als fluoreszierende Substanz eingekapselt. Anti-Leu 3a-monoklonaler Antikörper wird an dem FITC enthaltenden Mikrokapseln gemäss einem herkömmlichen Verfahren angebracht. Der mit FITC markierte monoklonale Antikörper wird der Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer aus Blut gemäss dem vorstehenden Verfahren hergestellten Zellsuspension, wobei die Zelloberfläche markiert ist, unterworfen. Die Zellen, deren Oberfläche auf diese Weise markiert ist, werden in einen Fließszytometer eingeführt. Die Zellen passieren das enge Rohr nacheinander einzeln mit konstanter Geschwindigkeit. Dabei werden die Zellen mit Licht einer speziellen Wellenlänge aus einer Lichtquelle bestrahlt. Da FITC als markierende Substanz verwendet wird, eignet sich ein Strahl mit einer Wellenlänge von 488 nm aus einem Argon-Ionenlaser. Durch den Laserstrahl angeregtes Licht wird als Fluoreszenzanteil mittels des Detektors 26 von Fig. 2, der senkrecht zum engen Rohr angeordnet ist, bestimmt. Das den Detektor 26 erreichende Signal wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und im Signalprozessor 27 von Fig. 2 mittels eines Photomultipliers verstärkt. Die Anzahl der Signale, die in den Detektor gelangen, entspricht der Zellzahl. Ein Histogramm lässt sich erhalten, indem man den Fluoreszenzanteil auf der x-Achse und die Anzahl der Zellen auf der y-Achse auf der Basis der so erhaltenen Signale aufträgt. Fig. 3 zeigt ein Histogramm im Fall der Messung von Lymphozyten unter Verwendung von anti-Leu 3a-monoklonalem Antikörper. Demgegenüber zeigt Fig. 4 ein nach einem herkömmlichen Verfahren erhaltenes Histogramm, bei dem eine fluoreszieren-

de Substanz direkt an anti-Leu 3a-monoklonalem Antikörper angebracht ist. In Fig. 3 und Fig. 4 bedeutet das Bezugszeichen 1 jeweils die Fluoreszenz aufgrund der Zellen selbst und das Bezugszeichen 2 jeweils die Fluoreszenz aufgrund der markierten Zellen.

Wie bereits erwähnt, ist Fig. 4 ein nach einem herkömmlichen Verfahren erhaltenes Histogramm, wobei eine fluoreszierende Substanz direkt an monoklonalem Antikörper gebunden ist.

Beim herkömmlichen Verfahren beträgt die Fluoreszenzintensität von Zellen, die nicht an monoklonalen Antikörper gebunden sind, d.h. von Zellen ohne Leu 3a-Antigen an ihrer Oberfläche, etwa 10, während die Fluoreszenzintensität von markierten Zellen etwa 10 mal so hoch wie die Intensität von Zellen ohne Leu 3a ist. Dagegen beträgt beim erfindungsgemässen Verfahren, bei dem eine Zellsuspension zur Markierung von Zellen mit Mikrokapseln hergestellt wird, die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen etwa das 100-fache der Zellen ohne Leu 3a-Antigen. Aus dieser Tatsache ist ersichtlich, dass es das erfindungsgemässe Verfahren ermöglicht, Zellen mit höherer Empfindlichkeit qualitativ und quantitativ zu bestimmen, als dies beim herkömmlichen Verfahren der Fall ist. Ausserdem ermöglicht das Verfahren den Nachweis eines Antigens, das auf der Zelloberfläche in geringen Mengen vorliegt. Es ist damit zur Analyse von Zelloberflächen geeignet.

Nachstehend wird eine weitere Ausführungsform der Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Fig. 5 zeigt ein Fließdiagramm einer derartigen Ausführungsform. Gemäss dieser Ausführungsform werden Mikrokapseln mit einer Mehrzahl von monoklonalen Antikörpern, die zur spezifischen Reaktion mit unterschiedlichen Antigenen an der Oberfläche der gleichen zu testenden Zelle in der Lage sind, markiert.

Eine Mehrzahl von unterschiedlichen Antikörpern ist an den Mikrokapseln angebracht. In Fig. 5 bezeichnet das Bezugszeichen 31 Mikrokapseln mit einem bestimmten, daran haftenden Antikörper und das Bezugszeichen 32 eine weitere Mikrokapselart mit daran haftendem, unterschiedlichem Antikörper. Diese markierten Antikörper werden mit einer Zelle 3, die auf ihrer Oberfläche eine Mehrzahl von Antigenen aufweist, zur Umsetzung gebracht. Die Mikrokapseln 31 und 32 enthalten die gleiche fluoreszierende oder lichtabsorbierende Substanz. Durch die vorstehende Umsetzung werden die markierten Antikörper an den entsprechenden Antigenstellen der Zielzellen gebunden. Da an jedem Antikörper eine Mikrokapsel haftet, ist der Absolutanteil der lichtabsorbierenden Substanz oder der fluoreszierenden Substanz, der in den Mikrokapseln enthalten ist, grösser als in der vorstehend anhand von Fig. 1 erläuterten Ausführungsform. Infolgedessen wird das Signal weiter verstärkt, so dass die qualitative und quantitative Analyse der spezifischen Zelle mit noch höherer Empfindlichkeit durchgeführt werden kann. Auch bei der Durchführung der Zellmessung unter Lichtstreuung wird die Intensität der Streuung erhöht, da eine grosse Anzahl von Mikrokapseln mit der zu messenden Zelle kombiniert wird und somit die Zellgrösse erhöht wird.

Entsprechend der vorstehend erläuterten Zellmessung mit Hilfe von Mikrokapseln, die mit einer Mehrzahl von unterschiedlichen Antikörpern markiert sind, ist auch eine Zellmessung mit Hilfe von Latexteilchen, die mit einer Mehrzahl von unterschiedlichen Antikörpern markiert sind, möglich. In diesem Fall wird die Intensität der Streuung aufgrund der zu testenden Zelle

weiter verstärkt, so dass die Zelle genauer qualitativ und quantitativ getestet werden kann.

Nachstehend wird ein konkretes Ausführungsbeispiel für diese Ausführungsform beschrieben. Eine Zellsuspension wird auf die gleiche Weise wie im Ausführungsbeispiel zur Erläuterung von Fig. 1 hergestellt und auf 100 µl aufgefüllt. Die Zellsuspension wird mit jeweils 5 bis 10 µl an Lösungen, die jeweils die unterschiedlichen monoklonalen Antikörper enthalten, versetzt. Die Reaktion wird bei 4°C durchgeführt. Mikrokapseln mit einem Gehalt an FITC sind vorher an diesem monoklonalen Antikörper angebracht worden. Nach 30 Minuten wird 2 ml Phosphatpuffer zugesetzt und 3 mal ein zentrifugaler Waschvorgang durchgeführt. Nach dem Waschen werden die Zellen in Phosphatpuffer unter Einstellung eines Gesamtvolumens von 4–500 µl resuspendiert. Als unterschiedliche monoklonale Antikörper können beliebige monoklonale Antikörper verwendet werden, die spezifisch mit den an der Oberfläche von Lymphozyten vorliegenden Antigenen, sofern Lymphozyten gemessen werden, reagieren. Beispielsweise sind Moleküle von OKT3 und Leu 1 an den Membranen von sämtlichen Arten von T-Zellen als antigene Determinanten vorhanden. Leu 3a und OKT4 sind auf der Oberfläche von Helfer-T-Zellen und Inducer-T-Zellen und Leu 2a und OKT8 an der Oberfläche von Killer-T-Zellen vorhanden. Daher kann die Zellmessung unter Verwendung einer Mehrzahl von monoklonalen Antikörpern, die diesen Antigenen entsprechen, durchgeführt werden, wobei die Anzahl von verschiedenen Typen von funktionellen T-Zellen bestimmt werden kann, d.h. mit hoher Empfindlichkeit qualitativ und quantitativ bestimmt werden kann.

Werden beispielsweise anti-Leu 1-monoklonale Antikörper und anti-OKT3-monoklonale Antikörper verwendet, werden jeweils 10 µl der einzelnen Vorratslösungen zu 100 µl der Zellsuspension gegeben, und anschliessend wird die Reaktion durchgeführt. Vorher sind Mikrokapseln mit einem Gehalt an FITC in haftende Verbindung mit den monoklonalen Antikörpern gebracht worden. Werden anti-Leu 1-monoklonale Antikörper und anti-OKT3-monoklonale Antikörper verwendet, lassen sich T-Zellen mit hoher Empfindlichkeit messen. Nach der Reaktion der Mikrokapseln, an denen jeweils monoklonale Antikörper haften, mit der Zelle, wird das gleiche Verfahren wie in der bei Fig. 1 erläuterten Ausführungsform durchgeführt, und die Zelle wird in ein Fliesszytometer gegeben. Ein Histogramm der zu testenden Zelle ist in Fig. 6 gezeigt. In Fig. 6 ist das Auftreten von zwei getrennten Peaks ersichtlich, was auf den Unterschied in der Menge der umgesetzten Antikörper zurückzuführen ist, d.h. auf den Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz zwischen den Zellen, wobei dieser Unterschied auf den unterschiedlichen Antigenmengen der Zellen beruht. In Fig. 6 bezeichnet das Bezugszeichen 1 die Fluoreszenz aufgrund der Zellen selbst und die Bezugszeichen 2 und 3 die Fluoreszenz aufgrund der markierten Zelle. Fig. 6 zeigt, dass die von der Kurve im Histogramm eingeschlossene Fläche grösser ist als im Histogramm von Fig. 6 und dass die Anzahl der Zellen, die den einzelnen Fluoreszenzintensitäten entsprechen und nachgewiesen werden können, im Vergleich zum Histogramm von Fig. 3 erhöht ist. Dieses Ergebnis wird durch die verbesserte Präzision der quantitativen Bestimmung aufgrund eines Anstiegs der Signalintensität erreicht.

Nachstehend wird eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemässen Zellmessung, die unter Verwen-

dung von fluoreszierenden Latexteilchen anstelle von Liposomen durchgeführt wird, beschrieben.

Zunächst wird ein Antikörper an fluoreszierenden Latexteilchen angebracht. Dadurch wird es den Teilchen ermöglicht, ein spezifisches Antigen auf der Oberfläche der Zellmembran zu erkennen.

100 µl Zellsuspension, die auf die gleiche Weise wie in dem vorstehend beschriebenen Ausführungsbeispiel hergestellt worden ist, werden einzeln mit 20 µl einer Suspension der fluoreszierenden Latexteilchen, an denen Antikörper haftet, versetzt und anschliessend 30 Minuten bei 40°C stehen gelassen. Nach Durchführung der Antigen-Antikörper-Reaktion wird der zentrifugale Waschvorgang mit Phosphatpuffer 3 mal wiederholt. Das erhaltene Produkt wird in 10 bis 500 µl Phosphatpuffer resuspendiert. Anschliessend wird die Suspension, die fluoreszierende Latexteilchen enthält, mit der zu messenden Zelle umgesetzt. Hierauf folgt die Fliesszytometrie.

Ein Versuch wird durchgeführt, wobei anti-Leu 3a als Antikörper, der an fluoreszierende Latexteilchen gebunden ist, verwendet wird. Das in diesem Versuch erhaltene Histogramm ist in Fig. 7 dargestellt.

Aus Fig. 7 ist ersichtlich, dass der Fluoreszenzanteil entsprechend der zu messenden Zelle im Vergleich zu Fig. 4, die ein herkömmliches Verfahren repräsentiert, in überraschender Weise erhöht ist.

3806558

FIG. 1

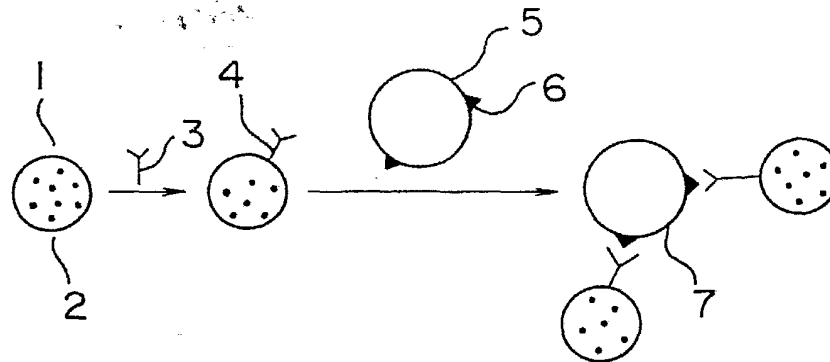
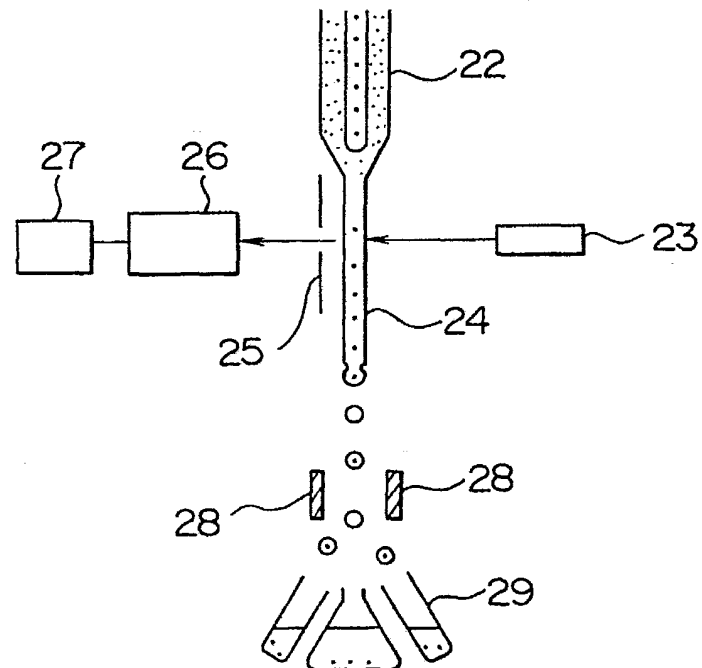


FIG. 2



010387

3806558

FIG. 3

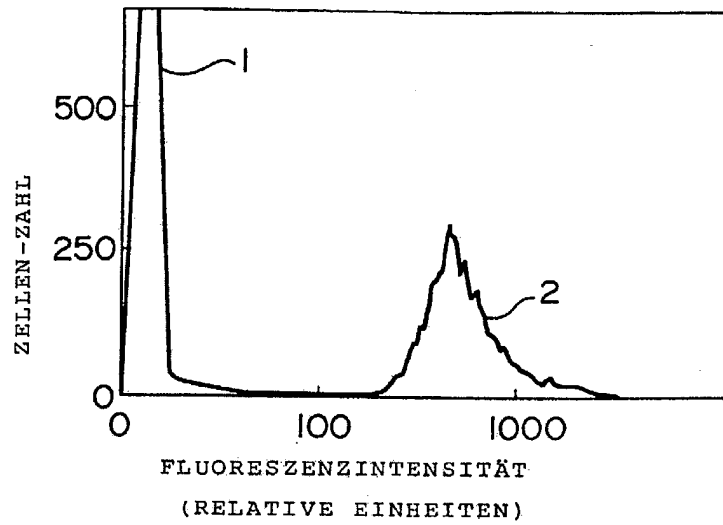
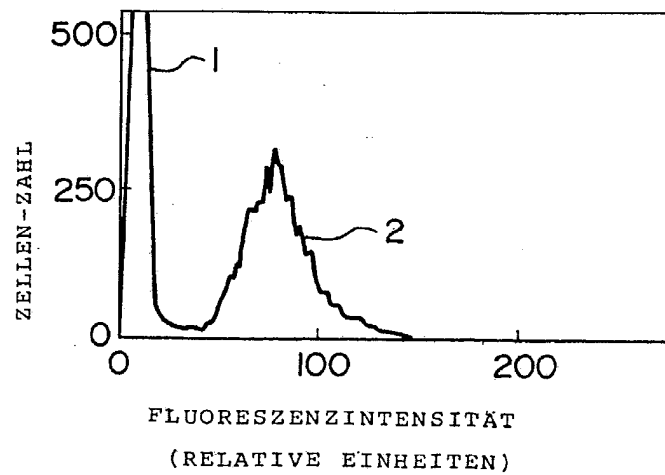


FIG. 4





3806558

FIG. 5

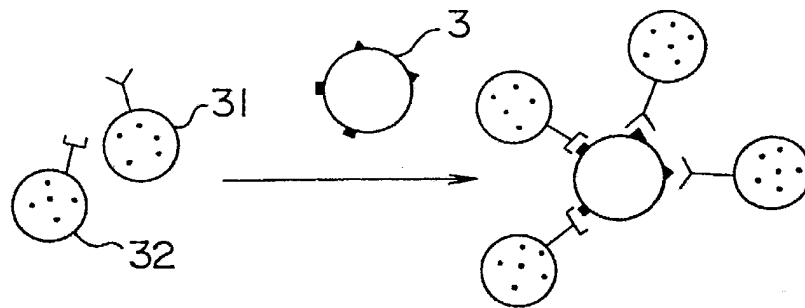
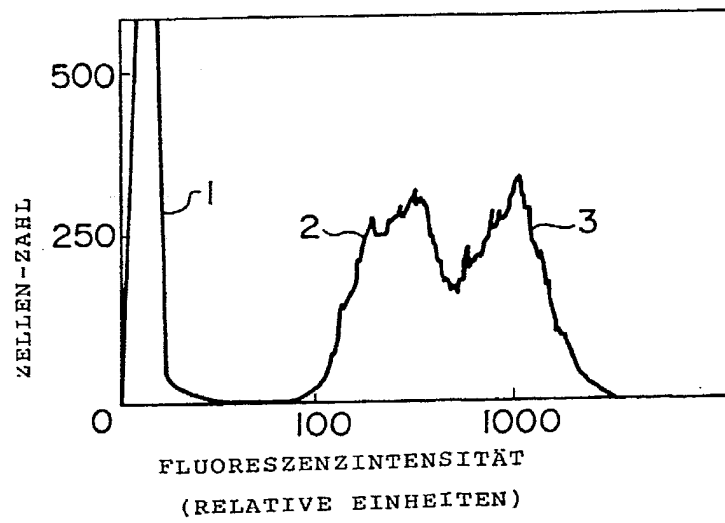


FIG. 6



3806558

FIG. 7

